



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ :	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/57151
G01N 21/64		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Dezember 1998 (17.12.98)
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP98/03535	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum:	11. Juni 1998 (11.06.98)	
(30) Prioritätsdaten:		Veröffentlicht
197 25 050.5 13. Juni 1997 (13.06.97) DE		Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten außer US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE). INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE HOCHTECHNOLOGIE [DE/DE]; Helmholtzweg 4, D 07743 Jena (DE).		
(72) Erfinder; und		
(73) Erfinder/Anmelder (nur für US): KARTHE, Wolfgang [DE/DE]; Kastanienstrasse 1, D-07747 Jena (DE). BRÄUER, Andreas [DE/DE]; Rabis 9, D-07646 Schlöben (DE). HISMANN, Frank [DE/DE]; Camsdorfer Strasse 5, D-07749 Jena (DE). KÖHLER, Michael [DE/DE]; Untergasse 8, D-07751 Golmsdorf (DE). WALDHÄUSL, Ralf [DE/DE]; Tatzendpromenade 30, D-07745 Jena (DE). DANZ, Norbert [DE/DE]; Pforte 2, D-07747 Jena (DE).		
(74) Anwalt: PFENNIG, MEINIG & PARTNER GBR; Gostritzer Strasse 61-63, D-01217 Dresden (DE).		
(54) Titel: DEVICE FOR DETECTING BIOCHEMICAL OR CHEMICAL SUBSTANCES BY FLUORESCENCE EXCITATION AND METHOD FOR ITS PRODUCTION		
(54) Bezeichnung: ANORDNUNG ZUR DETEKTION BIOCHEMISCHER ODER CHEMISCHER SUBSTANZEN MITTELS FLUORESENZLICHTANREGUNG UND VERFAHREN ZU DESSEN HERSTELLUNG		
(57) Abstract		
The invention relates to a device for detecting biochemical or chemical substances by fluorescence excitation and a method for its production. This method can be applied in various areas, for example in biotechnology, molecular biology, in the development of pharmaceuticals as well as for analysing various chemical substances. With this relatively simple device, detection of a large number of samples can be carried out quickly and with a high degree of precision. To this end, a plate-shaped substrate (1) with locally defined structure is used for detecting the different samples (5). A lens array (2) fitted on detector side and configured in accordance with the structure is preferably used to image the fluorescent light of the different samples on a detector array. A detector array adapted to the structure of the substrate can also be placed or mounted on the substrate.		
(57) Zusammenfassung		
Die Erfindung betrifft eine Anordnung zur Detektion biochemischer oder chemischer Substanzen mittels Fluoreszenzlichtanregung und ein Verfahren zu deren Herstellung, das auf verschiedenen Gebieten, wie z.B.		

Es besteht aber auch die Möglichkeit, ein der Strukturierung des Substrates entsprechender Detektorarray auf das Substrat aufzusetzen bzw. auf die Strukturierung einzustimmen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	MN	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5

10

15

**Anordnung zur Detektion biochemischer oder chemischer
Substanzen mittels Fluoreszenzlichtanregung
und Verfahren zu dessen Herstellung**

20 Die Erfindung betrifft eine Anordnung zur Detektion
biochemischer oder chemischer Substanzen mittels
Fluoreszenzlichtanregung und Verfahren zur Herstel-
lung einer solchen Anordnung. Die erfindungsgemäße
Anordnung ist auf verschiedenen Gebieten, wie z.B. in
25 der Biotechnologie, der Molekularmedizin, bei der
Pharmaentwicklung und auch bei der Analyse verschie-
dener chemischer Substanzen einsetzbar.

Seit geraumer Zeit werden die verschiedensten opti-
30 schen Verfahren und Systeme z.B. bei der Erforschung
verschiedener biologischer Systeme und Prozesse, in
der Mikrobiologie, der Molekularmedizin eingesetzt.
Dabei werden häufig Spektrometer verwendet, die einen
spezifischen Bereich des Spektrums abfiltern.

Die Spektrometer sind jedoch für die Durchflusshoch-
teneuntersuchungen ungeeignet, da eine aufwendige
Präparation der einzelnen Proben erforderlich ist.

die für die Messungen benötigten Zeiten zu lang sind und zur Denaturierung der Proben führen können.

Für viele Anwendungsfälle sind Lösungen gefordert,
5 mit denen eine schnelle, genaue und preiswerte Analyse einer sehr großen Anzahl von Proben (in einer Größenordnung von ca. 10^6) durchgeführt werden können. Solche Anwendungen sind beispielsweise DNA-Bibliotheken.

10 Für die Analyse bzw. Detektion wurden bisher verschiedene Meßverfahren angewendet. So wurde beispielsweise die Absorptionsänderung, die Brechzahländerung oder das angeregte Fluoreszenzlicht bestimmt. Bei der Messung der Intensität von Fluoreszenzlicht kann das Anregungslicht und das modifizierte Fluoreszenzlicht parallel oder senkrecht zueinander geleitet werden. Werden die beiden verschiedenen Lichtarten senkrecht zueinander geleitet, wird die Ausbildung eines evaneszenten Feldes an einem Wellenleiter ausgenutzt. Diese Form wird z.B. für den Nachweis von Antigen-Antikörper-Reaktionen ausgenutzt. Bei diesen sogenannten "solid-phase fluoroimmunoassays" werden nachweisspezifische Antikörper auf einer Sensoroberfläche immobilisiert. Der Analyt (Antigen) wird an einen entsprechenden Antikörper gebunden und kann dann, entweder direkt oder unter Verwendung eines Markierungsstoffes durch das evaneszente Feld fluoresziert, nachgewiesen werden. Die Anregung der Fluoreszenz durch das evaneszente Feld eines Wellenleiters bietet den Vorteil, daß die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes begrenzt ist (ca. 100 bis 200 nm) und dadurch lediglich die direkt an der Sensorfläche gebundenen Analyten oder Markierungsstoffe angeregt werden. Das führt dazu, daß die meßbare In-

tensität des Fluoreszenzlichtes ein direktes Maß für die Anzahl bzw. den Anteil an gebundenem Analyt bzw. Markierungsstoff ist und aus diesem Grunde auf zusätzliche Spülvorgänge, um ungebundene Markierungs-
5 stoffmoleküle zu entfernen, verzichtet werden kann.

Für solche Lichtwellenleiter können sowohl Lichtleitfasern als auch Schichtwellenleiter eingesetzt werden. Lichtleitfasern haben den Vorteil, daß entsprechende Sensoren bzw. Vorrichtungen einfach und kostengünstig herstellbar sind. Sie können an nahezu beliebigen und auch schwer zugänglichen Orten eingesetzt werden und die Meßsignale sind über bestimmte Entfernung ohne weiteres optisch übertragbar. So
10 ist es beispielsweise aus US 4,447,546 und US 4,909,990 bekannt, daß Lichtleitfasern für entsprechende Verfahren zwar prinzipiell einsetzbar sind, in der Regel jedoch ebene Schichtwellenleiter
15 verwendet werden.
20

Die ebenen Schichtwellenleiter haben den Vorteil, daß die verschiedensten zur Analyse anstehenden Substanzen und gegebenenfalls erforderliche Immobilisierungsschichten einfach aufgebracht und strukturiert
25 werden können. Mögliche Verfahren hierzu sind z.B. Schleudern, Gießen, Sputtern oder bekannte Vakuumbedampfungsverfahren. Außerdem können mehrere einzelne Sensoren aus einer einzigen großen Platte hergestellt werden, wobei die so hergestellten Sensoren nahezu
30 gleiche Eigenschaften aufweisen. Ein weiterer Vorteil solcher Sensorstrukturen besteht darin, daß sie sehr stabil und demzufolge auch gut handhabbar sind. Es können die verschiedensten Schichtmaterialien einfach

setzt werden.

Ebene plattenförmige Gebilde können ohne weiteres in
Nachweisgeräte eingesetzt und dort die optischen Meß-
verfahren durchgeführt werden.

Die Herstellung und Strukturierung solcher ebenen
Gebilde ist durch den Vorlauf aus der Mikroelektro-
nikfertigung bewährt und demzufolge auch mit relativ
geringen Kosten verbunden.

Biologische Sensorstrukturen, die die Ausbildung eva-
neszenter Felder für die Fluoreszenzlichtanregung
ausnutzen, sind beispielsweise von S. Sjölander und
C. Urbaniczky: Integrated Fluid Handling System for
Biomolekular Analysis, Anal. Chem., 63 81991) 2338 -
2345 und R. Cush et al: The resonant mirror: a novel
optic biosensor for direct sensing of biomolecular
interactions. Part 1: principles of operation and as-
sociated instrumentation. Biosensors Bioelectron., 8
(1993) 347 - 353 und J.E. Fletcher et al: A Rapid,
Biosensor-based, assay for PSA in Whole Blood, Tumor
Marker Update Vol. 5, No. 5 (1993). So liegen die
Nachweisgrenzen, bei dem von S. Sjölander und C. Ur-
baniczky beschriebenen Sensor bei 0,5 ng/ml (FCFD).

Eine weitere Vorrichtung für den Fluoreszenznachweis
biologischer Reaktionen mittels Evanescenzfeldanre-
gung eines Schichtwellenleiters ist in WO 94/27137
beschrieben, wobei dort eine Nachweisgrenze bei Ver-
wendung eines Referenzkanals bei 10^{-13} molaren Lösun-
gen liegt.

Bei dieser Lösung wird ein planarer Wellenleiter ver-
wendet, an dessen Oberfläche voneinander getrennte

Felder vorgesehen sind, auf bzw. in denen Fänger moleküle immobilisiert sind und für die verschiedenen Felder auch verschiedene Proben mittels Evanszenzfeldanregung in Form von Fluoreszenzimmunoassys bestimmt werden können. Dabei wird das Licht zwingend über eine Stirnfläche des planaren Wellenleiters, in einer bevorzugten Ausführung über eine linsenförmige Ausbildung dieser Stirnfläche, in den planaren Wellenleiter eingekoppelt und an der Grenzfläche das evanescente Feld ausgebildet und Fluoreszenz angeregt. Das Fluoreszenzlicht tritt an der gegenüberliegenden Seite des Wellenleiters aus und kann mit den üblichen Detektoren gemessen werden, wobei die Strahlführung mit verschiedenen optischen Elementen beeinflußt werden kann. Dadurch treten zwei wichtige Nachteile auf, die die Meßempfindlichkeit, wie bereits erwähnt, negativ beeinflussen. Zum einen ist eine Beeinflussung des Fluoreszenzlichtes verschiedener Proben, die in den Feldern enthalten sind, nicht auszuschließen, da eine vollständige optische Trennung nicht möglich ist und zum anderen treten Probleme durch die ausschließliche Einkopplung des Lichtes über die Stirnseite des Wellenleiters auf, so daß größere Lichtverluste in Kauf genommen werden müssen.

Zur Verringerung des Streulichteinflusses wird dort zwar die Verwendung von entsprechenden optischen Filtern vorgeschlagen, die jedoch ebenfalls Fluoreszenzlichtverluste hervorrufen und die bereits erwähnte Beeinflussung des Fluoreszenzlichtes der verschiedenen Proben nicht vollständig verhindern können.

In der EP 0 519 622 A2 ist eine andere Vorrichtung

verwendet werden soll, wobei das Licht für die Fluoreszenzanregung über eine ebene oder gewölbte Fläche des schalenförmigen Sensors in die Mantelfläche des Sensors eingekoppelt und die Fluoreszenz in der auf die äußere Mantelfläche des Sensors aufgebrachten Probe angeregt wird. Das Fluoreszenzlicht gelangt wieder über die Mantelfläche des schalenförmigen Sensors und die ebene bzw. gewölbte Fläche, über die das Anregungslicht in die Mantelfläche des Sensors eingekoppelt wird, über ein optisches System zu einem Detektor, mit dem die Intensität des Fluoreszenzlichtes bestimmt werden kann. Dabei wird nach einem Ausführungsbeispiel das Anregungslicht über einen halbdurchlässigen Spiegel in den Sensor eingekoppelt und das Fluoreszenzlicht durch den halbdurchlässigen Spiegel auf den Detektor gerichtet. Mit einer solchen Vorrichtung kann prinzipiell gleichzeitig nur eine einzige Probe detektiert werden.

In WO 95/03538 ist ein optischer Biosensor beschrieben, bei dem eine Lochplatte, deren Löcher in einer Matrixanordnung ausgebildet sind, in Verbindung mit einem planaren Wellenleiter und einer Grundplatte beschrieben. Das Licht einer Lichtquelle wird auf die Grundplatte gerichtet und über den Löchern der Lochplatte ausgebildete Beugungsgitter in den Wellenleiterfilm eingekoppelt. Durch die in den Löchern aufgenommenen Proben tritt eine Änderung des Brechungsin- dex des Wellenleiterfilms auf, der zu einer Verände- rung des Winkels des austretenden Lichtes führt, die als Meßwert ausgenutzt wird.

In der DE 41 15 414 A1 ist ein miniaturisiertes Chemo- und Biosensorelement mit ionenselektiver Membran beschrieben, das in einem Siliciumsubstrat sich ver-

jüngende Öffnungen aufweist und in das so erhaltene Containment eine Flüssigkeit, mit der eine ionenselektive Membran ausgebildet werden kann, eingefüllt wird.

5

Die Lösungen, die von S. Sjölander und C. Urbaniczky sowie R. Cush et al beschrieben worden sind, weisen Brechzahländerungen nach, die durch eine Anlagerung von Analyten an einer Oberfläche hervorgerufen werden. Die gemessene Brechzahländerung beinhaltet jedoch nicht ausschließlich die jeweils zu untersuchende Anlagerung und die erreichbare Selektivität ist demzufolge nicht in jedem Fall gegeben. Für die entsprechend durchgeföhrten Messungen ist ein sehr hoher apparativer Aufwand erforderlich, der sich auch in relativ hohen Kosten widerspiegelt. Untersuchungen mehrerer Proben, die gleichzeitig durchgeföhrt werden können, ist nicht möglich.

20

Bei dem von J.E. Fletcher et al beschriebenen Biosensor bewirkt die relativ großflächige Anregung der Fluoreszenz und deren evaneszentes Einkoppeln in einen Schichtwellenleiter im FCFD eine relativ geringe Empfindlichkeit.

25

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine Möglichkeit zu schaffen, mit der relativ einfach und mit hoher Genauigkeit die Detektion an einer großen Anzahl von Proben in sehr kurzer Zeit durchgeföhrt werden kann.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruchs 1 gelöst.

chen aus einem plattenförmigen Substrat, das zur Detektion mehrerer Proben lokal strukturiert ist, wobei die Strukturierung bevorzugt in Form eines zweidimensionalen Arrays, wie sie beispielsweise von den bekannten Mikrotiterplatten bekannt ist, ausgebildet werden soll.

Entsprechend der im Substrat oder der nur in einer Pufferschicht ausgebildeten Strukturierung kann detektorseitig ein Linsenarray aufgesetzt werden, wobei die Strukturierung und auch das Linsenarray sehr klein ausgebildet sein können, so daß auf einem kleinflächigen Substrat eine große Anzahl von auf verschiedenen Proben aufgebracht und detektiert werden können. An Stelle des Linsenarrays kann aber auch eine der Strukturierung angepaßte Linse, z.B. eine Fresnellinse hierfür verwendet werden. Auf der dem Linsenarray abgewandten Seite des Substrates kann eine Pufferschicht und ein entsprechend der im Substrat eingearbeiteten Strukturierung ausgebildetes Wellenleiterarray aufgebracht werden.

Jede der im Substrat eingearbeiteten Mikrostruktur definiert einen Fluoreszenzanregungs- und -nachweis-kanal für jeweils eine der zu detektierenden Proben.

Für die Anregung des Fluoreszenzlichtes bestehen prinzipiell zwei Möglichkeiten, so kann einmal das evaneszente Feld in einem Wellenleiterarray ausgebildet werden, das auf der Seite des Substrates ausgebildet ist, die der Detektorseite gegenüberliegt. Die zweite Möglichkeit der Anregung besteht darin, das Anregungslicht über das der Strukturierung im Substrat angepaßte Linsenarray auf die einzelnen Proben zu richten, wobei in jedem Fall das Fluoreszenzlicht

über das am Substrat detektorseitig angeordnete Linsenarray auf dem Detektor abgebildet werden kann. Der Detektor ist hierfür ebenfalls in Form eines Arrays, z.B. als CCD-Array ausgebildet, so daß das Fluoreszenzlicht jeder einzelnen Probe gesondert detektiert werden kann.

Für den Fall der Evaneszentfeldanregung besteht aber auch die Möglichkeit, auf das Linsenarray zu verzichten und dafür ein der Strukturierung angepaßtes Detektorarray auf das Substrat aufzusetzen bzw. an dieses so anzordnen, daß die verschiedenen Proben selektiv detektiert werden können.

Die Strukturierung der Substrate, die beispielsweise aus der Halbleitertechnik bekannte Formate von 4''x 4'' aufweisen können, sind mit den dort bekannten Bearbeitungsverfahren für Silicium einfach und kostengünstig herstellbar, dabei kann auf einem solchen Substrat eine Mikrostrukturierung erreicht werden, die eine Probenanzahl von bis zu $10^6/\text{cm}^2$ ermöglicht.

Das erfindungsgemäß zu verwendende Substrat kann verteilt sichern, daß die verschiedensten Fluoreszenzlichtsignale, die mit dem Detektorarray ausgeworfen werden sollen, sich nicht gegenseitig beeinflussen bzw. überlagern, so daß jeder Probe ein eindeutiger Meßwert ohne Störgrößen zugeordnet werden kann. Hierfür besteht das Substrat bevorzugt aus einem Material, das bei der/den Lichtwellenlängen des Fluoreszenzlichtes dieses absorbiert. Für die gleiche Wirkung besteht jedoch die Möglichkeit, die jeweili-

10

Effekt vermieden werden kann.

Die bevorzugte Strukturierung im Substrat, durch Ausbildung von pyramiden- oder kegelförmigen oder auch senkrechten Durchbrüchen hat weiter den Vorteil, daß das Fluoreszenzlicht günstig reflektiert und dadurch gesammelt in Richtung auf das Linsenarray und demzufolge auch auf die jeweiligen Detektoren gerichtet werden kann.

10

Mit der erfindungsgemäßen Anordnung ist die Detektion von Molekülkonzentrationen, die 10^{-12} molar oder geringer sind, in großer Anzahl für verschiedene Proben in sehr kurzer Zeit möglich. Außerdem kann das anregende Licht exakt definiert auf die jeweilige Probe gerichtet und das jeweils entsprechende Fluoreszenzlicht, bei weitestgehender Vermeidung von Streulichtanteilen oder anderen Störgrößen direkt auf den jeweiligen einer einzigen Probe zugeordneten Detektor gerichtet und der entsprechende Analyt gegebenenfalls auch quantitativ bestimmt werden.

Mit der erfindungsgemäßen Lösung kann nicht nur eine verbesserte ortsaufgelöste Messung durchgeführt werden, es besteht optional die Möglichkeit mit einer entsprechenden zeitlich steuerbaren Detektoranordnung (z.B. triggerbare CCD-Kamera und elektronische Verzögerungseinheit) auch zeitaufgelöste Messungen durchzuführen.

30

Nachfolgend soll die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher beschrieben werden.

Dabei zeigen:

35

- Figur 1 ein Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Anordnung mit Fluoreszenzanregung über evaneszentes Feld;
- 5 Figur 2 ein zweites Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Anordnung mit Fluoreszenzanregung über Mikrolinsenarray;
- Figur 3a eine Anordnung nach Figur 1 mit und ohne Linsenarray; Probe auf der umstrukturierten Seite;
- 10 Figur 3b eine Anordnung mit bis zur Wellenleiterschicht reichenden Durchbrüchen mit und ohne Linsenarray, und Proben in Durchbrüchen;
- Figur 4a eine Anordnung mit zusätzlicher Zwischenschicht und unterhalb von Wellenleiter und Substrat angeordneten Proben;
- 15 Figur 4b eine Anordnung mit zusätzlicher Zwischenschicht und oberhalb des/der Wellenleiter angeordneten Proben und
- 20 Figur 5 eine Anordnung mit einer strukturierten Pufferschicht.

Bei dem in der Figur 1 dargestellten Beispiel einer erfindungsgemäßen Anordnung wird ein Siliciumsubstrat 1, z.B. ein bekannter Siliciumwafer verwendet, der einseitig mit einem Schichtpaket aus dotiertem Siliciumdioxid oder einem anderen Silikat versehen wird, dargestellt. Dabei besteht das Schichtpaket aus einer Pufferschicht 3 und einer Wellenleiterschicht 4.

30 Auf der entgegengesetzten Seite, also der Seite, die zu einem nicht dargestellten Detektorarray weist, Durchbrüche 6 in Form eines regelmäßigen Arrays im

eingebracht werden, wobei das Siliciumdioxid als Ätzstoppschicht wirkt und demzufolge die Durchbrüche 6 an der Siliciumdioxidschicht, also an der Pufferschicht 3 enden.

5

Die Durchbrüche 6 können dabei Pyramiden- und Kegelform oder auch Quaderform aufweisen, und dienen zur Trennung der verschiedenen Fluoreszenzlichtstrahlen für die jeweiligen Proben 5, die unterhalb der Wellenleiterschicht 4 den Durchbrüchen 6 zugeordnet und bevorzugt unter Verwendung von jeweils selektiven Immobilisierungsschichten aufgebracht sind. Die Proben 5 können dabei, je nachdem, sowohl flüssige als auch feste Konsistenz aufweisen.

15

Erfolgt die Fluoreszenzanregung über das evaneszente Feld der Wellenleiter 4, wird das Fluoreszenzlicht für jede Probe 5 durch die entsprechende Durchbrechung 6 über eine der Linsen des Linsenarrays 2 auf einen Detektor eines Detektorarrays gerichtet, wobei jeweils ein Einzeldetektor des Detektorarrays einer Probe 5 zugeordnet ist und demzufolge die Intensität einer Fluoreszenz für jeweils eine Probe 5 gemessen werden kann.

25

Neben Silicium können auch andere Substratmaterialien, wie z.B. verschiedene Polymere eingesetzt werden, die beispielsweise eingefärbt sind und so das Fluoreszenzlicht aus verschiedenen Proben absorbiert wird, so daß Übersprechen zwischen den Nachweiskanälen vermieden werden kann. Bei beispielsweise polymeren Substratmaterialien kann deren Strukturierung neben Ätzverfahren (Trockenätzverfahren) auch durch eine entsprechende Laserbearbeitung oder mittels Replikationstechniken erfolgen.

Bei dem in der Figur 2 dargestellten Beispiel einer erfindungsgemäßen Anordnung wird wiederum ein Substrat 1 mit einer Pufferschicht 3 versehen, an der verschiedene Proben 5 den jeweiligen Durchbrüchen 6 5 zugeordnet immobilisiert werden können. Innerhalb des Substrates 1, also wieder in Richtung auf den nicht dargestellten Detektor weisend, ist ein Linsenarray 2 mit jeweils einer einem Durchbruch 6 zugeordneter Einzellinse aufgesetzt, mit der Hilfe das Fluoreszenzlicht auf jeweils einen Detektor des Detektorarrays gerichtet werden kann.

Die Fluoreszenzanregung erfolgt durch Anwendung mindestens einer Lichtquelle 7, die bevorzugt ein Laser 15 oder eine Laserdiode sein kann.

Erfolgt die Fluoreszenzanregung über ein Mikrolinsenarray, gelangt das Licht der Lichtquelle 7 über eine Optik 10 auf ein zweites Linsenarray 8 und wird von 20 dort über einen halbdurchlässigen Spiegel 9 durch jeweils einen Durchbruch 6 auf eine einzelne Probe 5 gerichtet. Das Fluoreszenzlicht der jeweiligen Probe 5 kann den halbdurchlässigen Spiegel 9 in Richtung auf das nicht dargestellte Detektorarray passieren. 25 Die Anzahl der einzelnen Linsen in den beiden Linsenarrays 2 und 8 ist identisch, wobei die Anordnung der einzelnen Linsen im Linsenarray 8 genau so gewählt wird, daß jeweils Licht, das durch eine Linse des zweiten Linsenarrays 8 über den halbdurchlässigen 30 Spiegel 9 genau durch eine Durchbrechung 6 in Richtung auf eine Probe 5 zur Fluoreszenzlichtanregung gerichtet werden kann.

länge bzw. unterschiedlichen Wellenlängenspektrums aussenden, wobei hierfür günstigerweise jeweils getrennte zweite Lichtwellenarrays 8 verwendet werden.

5 Es besteht aber auch die Möglichkeit, vor bzw. nach den einzelnen Linsen der Linsenarrays 2 und 8 Filter und/oder Polarisatoren einzusetzen, um den Fehlereinfluß weiter zu verringern.

10 Die in den Figuren 1 und 3a gezeigte Anordnung mit der Wellenleiterschicht 4 wird in einem zusätzlichen Arbeitsgang, der von der Herstellung der Durchbrüche 6 unabhängig ist, mit einem Beschichtungs-, Maskierungs- und Strukturierungsprozeß behandelt, so daß 15 ein Streifenwellenleiterarray entsteht, dessen Struktur an die im Substrat 1 ausgebildete Struktur mit den Durchbrüchen 6 angepaßt ist.

20 Im Nachgang hierzu können dann unterschiedliche selektive Immobilisierungsschichten, den verschiedenen Durchbrüchen 6 zugeordnet, aufgebracht werden, so daß jeweils unterschiedliche Analyten immobilisiert und detektiert werden können.

25 Vorteilhaft kann eine solche modifizierte Sensorfläche den Abfluß einer Durchflußmeßzelle bilden, durch die Proben- und Referenzlösung eingebracht werden können.

30 Ein weiteres Beispiel für eine erfindungsgemäße Anordnung ist in der Figur 3b gezeigt. Bei diesem Beispiel wurde auch die Siliciumdioxidpufferschicht 3 durchgeätzt und es entstanden Hohlräume für die Aufnahme von Proben. Dabei ist die Wellenleiterschicht 4 am Boden der jeweiligen Durchbrüche 6 mit einer Immo-

bilisierungsschicht für die verschiedenen Substanzen (Biomoleküle) versehen. In die Durchbrüche 6 können z.B. mit einer bekannten Pipettierzvorrichtung die jeweiligen Proben eingebracht werden und die Fluoreszenzanregung so erfolgen, wie dies bei der Beschreibung der Figur 2 der Fall ist.

In den Figuren 4a und 4b sind mögliche Varianten für die Anordnung einer zusätzlichen Zwischenschicht 4a dargestellt, die die Immobilisierung der Proben verbessern sollen. Eine solche Zwischenschicht 4a ist aus einem für das Anregungslicht transparenten Material und wird mit einer kleinen Dicke (ca. 10 bis 50 nm) ausgebildet, die sicherstellt, daß die Ausbildung des evaneszenten Feldes nicht oder nur sehr geringfügig beeinflußt wird.

Geeignete Materialien sind z.B. Silikat, Quarz, die mit dem gleichen Verfahren aufgebracht werden können, mit dem auch die Wellenleiter ausgebildet werden. Es können aber auch optisch und biologisch bzw. chemisch geeignete Polymere als Zwischenschichtmaterial verwendet werden.

Bei dem Beispiel nach Figur 4b, kann eine solche Zwischenschicht 4a, in nicht dargestellter Weise, auch als dünner Flüssigkeitsfilm in den Durchbrechungen 6 im Substrat 1 unmittelbar zwischen Pufferschicht 3 und Probe 5 ausgebildet werden.

In der Darstellung nach Figur 4a sind die Proben 5 unterhalb der Wellenleiter 4 angeordnet, wobei die zusätzliche Zwischenschicht 4a zwischen den Proben 5

vorhanden. Bei diesem Beispiel ist eine Mikrooptik 11 optional über dem strukturierten Substrat 1 vor dem nicht dargestellten Detektor angeordnet.

5 Beim in der Figur 4b gezeigten Beispiel sind die Proben 5 in den Durchbrüchen 6 des Substrates 1 aufgenommen und zwischen Proben 5 und Pufferschicht 3 die Zwischenschicht 4a angeordnet.

10 Das in Figur 5 dargestellte Beispiel verwendet eine strukturierte Pufferschicht 3a, in der Durchbrüche 12 ausgebildet sind. Die Proben 5 können in diesen Durchbrüchen 12 wieder auf der zusätzlichen Zwischenschicht 4a immobilisiert werden. Der übrige Teil der entsprechenden Anordnung ist hier wieder aus den Einzellementen Substrat 1 (auf das ggf. verzichtet werden kann), Wellenleiter 4 und Pufferschicht 3 gebildet, wobei hier das Substrat unstrukturiert sein kann.

15
20
25
30
35 Die mit den Durchbrüchen 12 versehene Pufferschicht 3a ist aus einem Material, das die Wellenleitung, wenn überhaupt nur geringfügig beeinflußt. Die Durchbrüche 12 sind so ausgebildet und dimensioniert, daß das evaneszente Feld der Wellenleiter 4 im Bereich der Zwischenräume zwischen den Durchbrüchen 12 die Oberfläche der Pufferschicht 3 nicht erreicht und eine Beeinflussung des Fluoreszenzlichtes ausgeschlossen ist. Die Fluoreszenzanregung kann, wie bereits beschrieben erfolgen, und das Fluoreszenzlicht tritt mit einer entsprechenden Apertur aus den Durchbrüchen 12 aus und kann mit der hier gezeigten Mikrooptik 11 oder einem Linsenarray 2 bzw. einer strukturierten Linse auf ein nicht gezeigtes Detektorarray zur ortsaufgelösten Auswertung der einzelnen Fluoreszenzintensitäten, gerichtet werden.

Patentansprüche

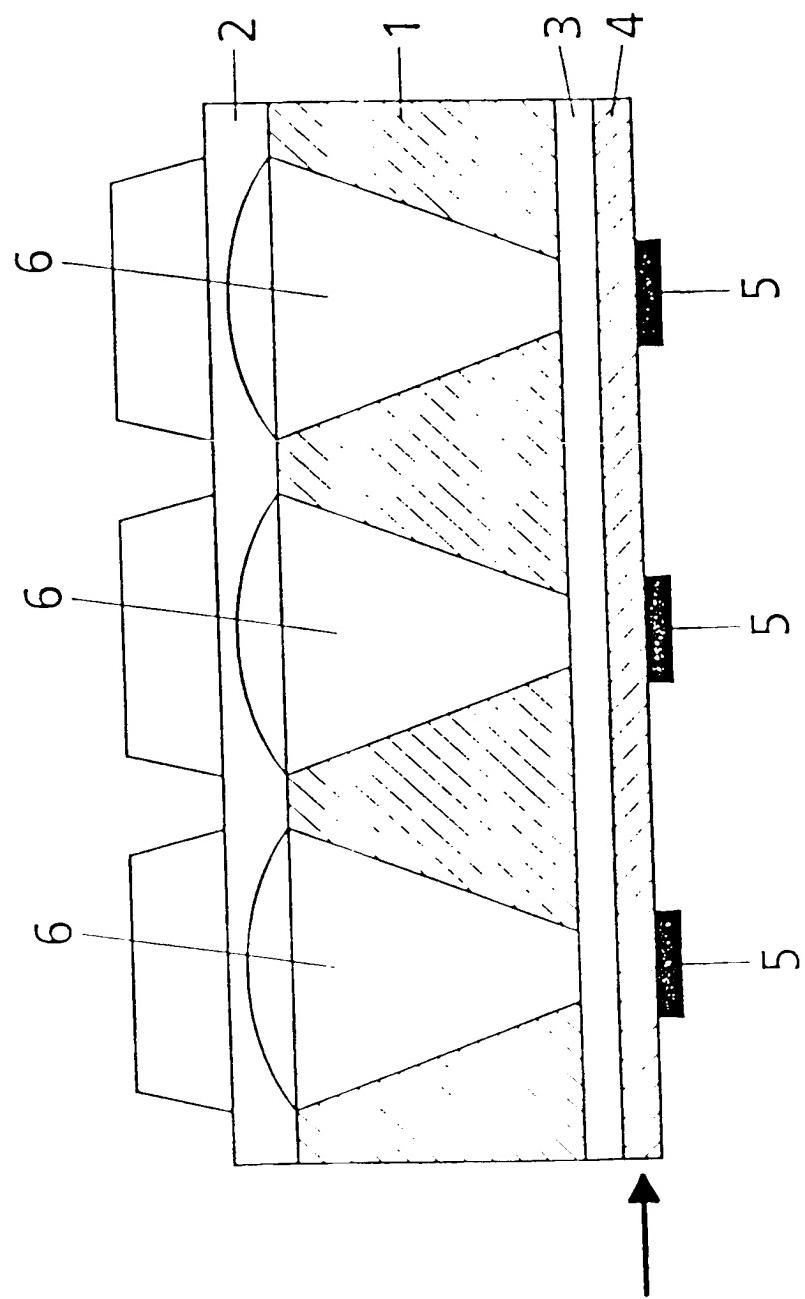
1. Anordnung zur Detektion biochemischer oder chemischer Substanzen mittels Fluoreszenzlichtanregung, bei der
5 ein plattenförmiges Substrat (1) oder eine Pufferschicht (3) zur Detektion verschiedener Proben (5) lokal definiert strukturiert ist und
10 detektorseitig ein der Strukturierung entsprechend ausgebildetes Linsenarray (2) oder eine der Strukturierung angepaßte Linse zur Abbildung des Fluoreszenzlichtes der verschiedenen Proben (5) vor einem Detektorarray angeordnet oder ein der Strukturierung des Substrates (1) entsprechend ausgebildetes Detektorarray auf das Substrat (1) aufsetzbar ist,
15 daß durch gekennzeichnet, daß die Strukturierung in Form von Durchbrüchen (6) als Fluoreszenznachweiskanal und/oder Fluoreszenzanregungskanal für jeweils eine zu detektierende Probe ausgebildet ist.
2. Anordnung nach Anspruch 1,
25 dadurch gekennzeichnet, daß entsprechend der Strukturierung verschiedene selektive Immobilisierungsschichten aufgebracht sind.
3. Anordnung nach Anspruch 1 oder 2,
30 dadurch gekennzeichnet, daß die Durchbrüche (6) pyramiden- oder kegelförmig oder auch senkrecht und zumindest bis zu einer Pufferschicht (3) im Substrat (1) ausgebildet sind und die Puffersch-

4. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Proben in den Durchbrüchen (6) oder auf der ebenen Seite der Anordnung gegenüber den Durchbrüchen (6) immobilisiert sind.
5
5. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat (1) aus einem das Fluoreszenzlicht absorbierenden Material besteht oder an seiner Oberfläche für Fluoreszenzlicht reflektierend oder absorbierend ausgebildet ist.
10
6. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Wandungen der Durchbrüche (6) Fluoreszenzlicht reflektieren.
15
7. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregung der Fluoreszenz über das evaneszente Feld erfolgt.
20
8. Anordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß auf der dem Linsenarray (2) oder der Linse abgewandten Seite des Substrates (1) ein Schichtpaket, bestehend aus einer Pufferschicht (3) und mindestens einem Wellenleiter (4) oder einem der Strukturierung angepaßten Wellenleiterarray (4) aufgebracht ist.
25
30
9. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat (1) aus Silicium, Glas, glasartigem Material oder einem Polymer und die Pufferschicht (3) und der/die Wellenleiter (4) aus einem Silikat, Glas, glas-
35

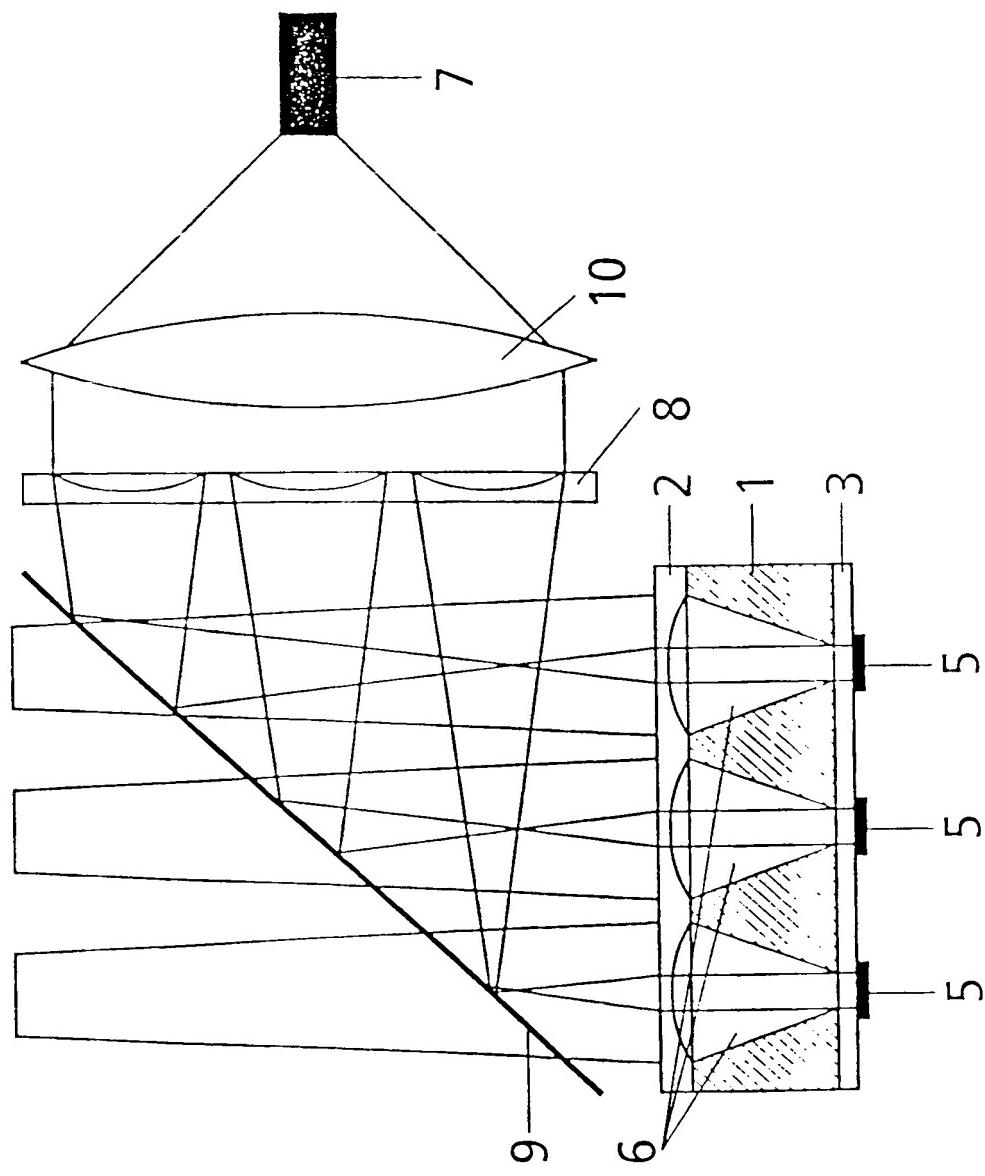
artigem Material oder einem Polymer bestehen.

10. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, daß das Anregungslicht
5 mindestens einer Lichtquelle (7) über ein zweites Linsenarray (8) oder eine der Strukturierung angepaßte zweite Linse durch das erste Linsenarray (2) oder die erste der Strukturierung angepaßte Linse auf die Proben (5) gerichtet ist.
10
11. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen dem ersten und dem zweiten Linsenarray (2, 8) und/oder den Linsen ein halbdurchlässiger Spiegel (9) angeordnet ist.
15
12. Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Wellenleiter (4) eine für das Anregungslicht transparente Zwischenschicht (4a), mit einer kleinen Dicke, die die Evaneszenzfeldanregung nahezu nicht beeinflußt, auf der die Proben immobilisieren, angeordnet ist.
20
- 25 13. Verfahren zur Herstellung einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß auf einer Seite eines Substrates (1) eine Pufferschicht (3) aufgebracht und im Substrat (1), ausgehend von der hierzu abgewandten Seite Durchbrechungen (6) zumindest bis zur Pufferschicht (3) ausgebildet werden.
30

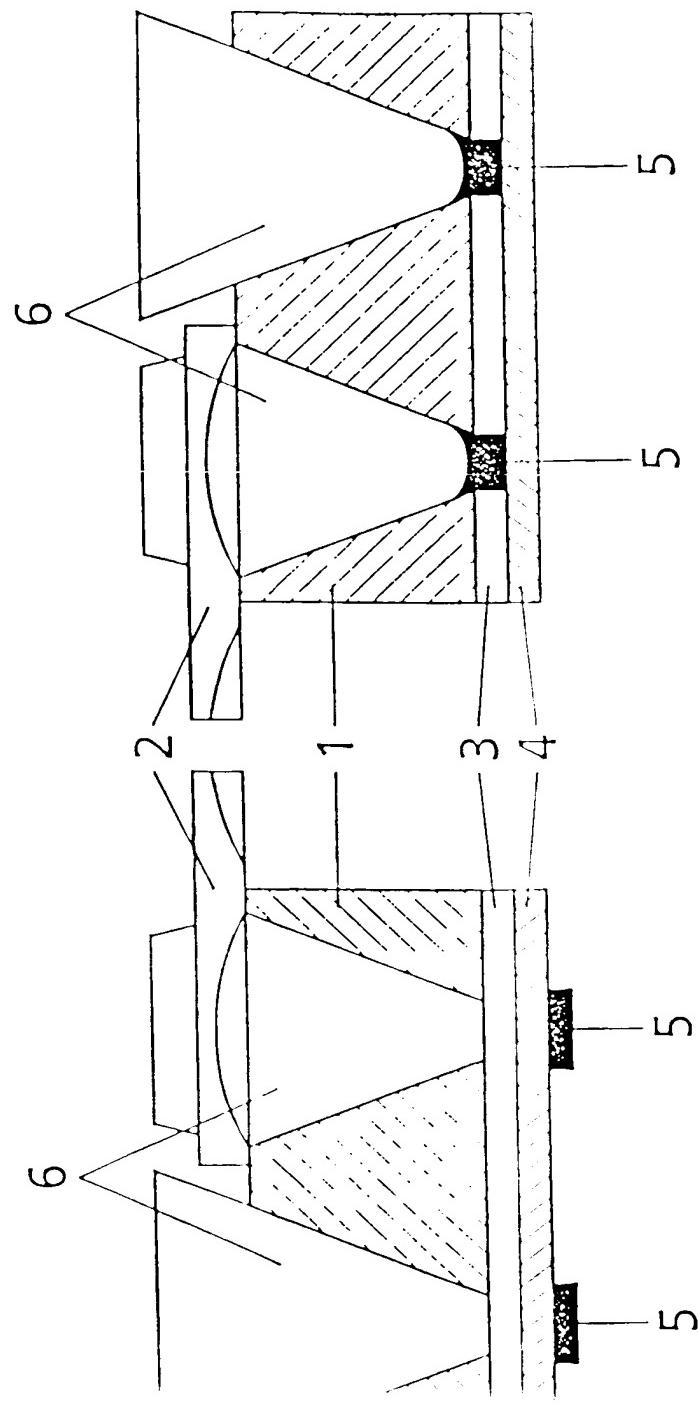
14. Verfahren zur Herstellung einer Anordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet, daß auf einer Seite des Substrates (1) eine Puffer- und eine Wellenleiter-
schicht (3, 4) aufgebracht, im Substrat (1)
ausgehend von der abgewandten Seite Durchbre-
chungen (6) zumindest bis zur Pufferschicht (3)
ausgebildet werden und mit einem Strukturie-
rungsverfahren ein Streifenwellenleiterarray (4)
jeweils den Durchbrüchen (6) zugeordnet ausge-
bildet wird.
15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14
dadurch gekennzeichnet, daß auf die Puffer-
schicht (3) oder die Streifenwellenleiterstruk-
tur (4) verschiedene selektive Immobilisierungs-
schichten, den Durchbrüchen (6) zugeordnet, auf-
gebracht werden.
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15,
dadurch gekennzeichnet, daß die Durchbrechungen (6) bis zur Streifenwellenleiterstruktur (4)
ausgebildet und die verschiedenen Immobilisie-
rungsschichten auf der Streifenwellenleiter-
struktur (4) in den Durchbrüchen (6) aufgebracht
werden.



Figur 1



Figur 2



Figur 3b

Jr 3a

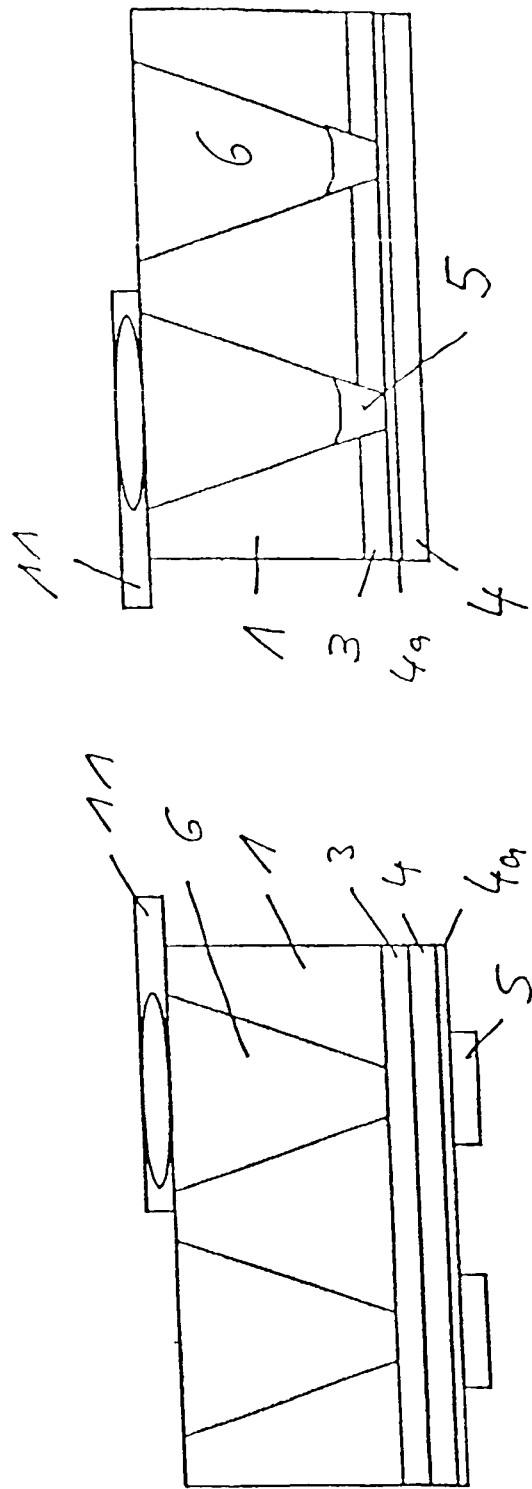
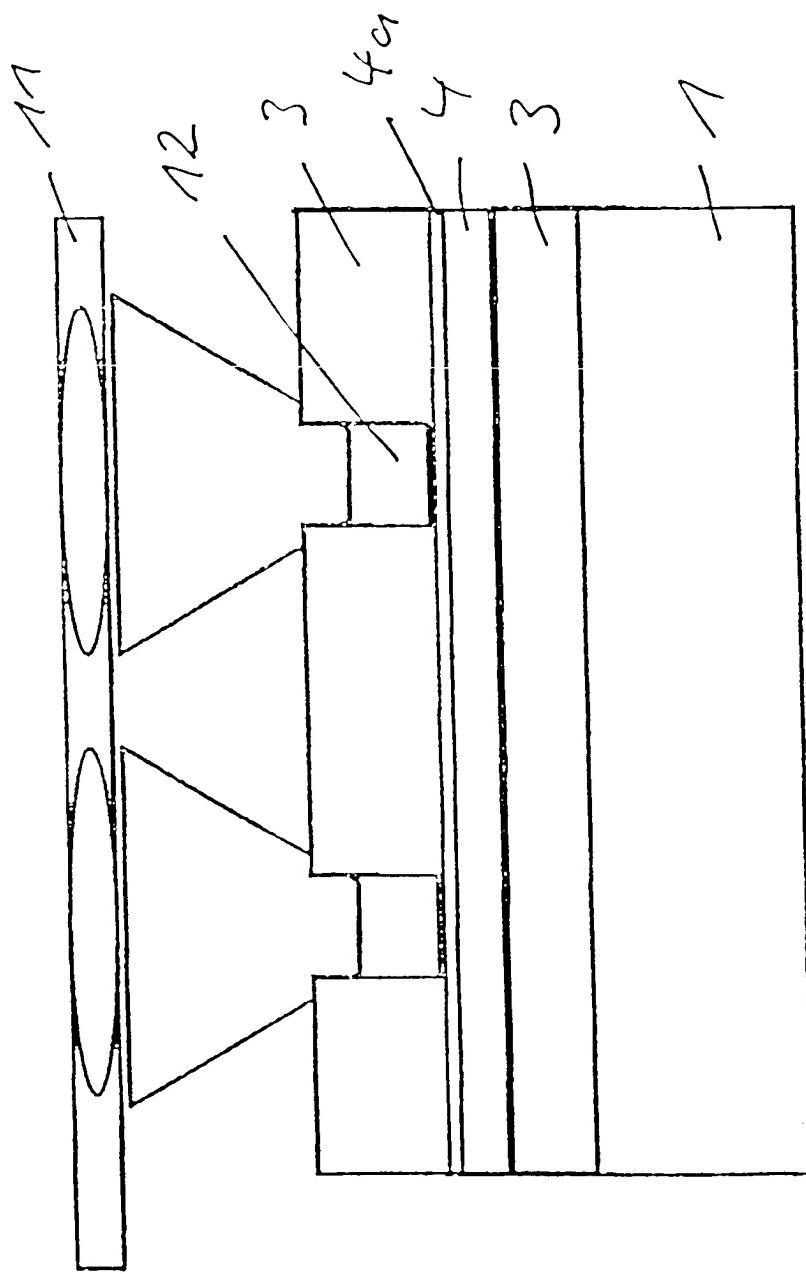


Figure 4b

Figure 4a

Figure 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/03535

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are indicated in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	EP 0 723 146 A (STANFORD RES INST INT). 24 July 1996 see page 4, line 26 - page 6, line 9 see page 22, line 39 - page 23, line 9 see figures 7A,7B ---	1,2,7,9, 12
Y	WO 95 03538 A (BALZERS HOCHVAKUUM .ARTIFICIAL SENSING INSTR ASI A (CH); RUDIGIER) 2 February 1995 cited in the application see page 5, line 18 - page 6, line 20 see figures 1-3 ---	1,2,7,9, 12
A	EP 0 194 132 A (DX CO LTD) 10 September 1986 see page 2, line 22 - line 31 see page 4, line 9 - page 5, line 7 see page 15, line 23 - page 16, line 14 --- -/-	1

Further documents are listed in the continuation of box C

Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "U" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 October 1998

Date of mailing of the international search report

21/10/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Krametz, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 96/03535

C. CONTINUATION DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Priority information, if any, given in the application which is appropriate for eventual claims
and the date of filing of the application

A	DE 41 15 414 A (KNOLL MEINHARD PROF DR) 12 November 1992 cited in the application see column 6, line 35 - line 65 see claims 1-3	1.3.9.13
A	EP 0 519 422 A (CIBA CORNING DIAGNOSTICS CORP) 23 December 1992 cited in the application see column 4, line 43 - line 46 see column 10, line 20 - column 11, line 28 see figure 3	11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 98/03535

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0723146	A	24-07-1996	AT	170004 T	15-09-1998
			CA	2144527 A	31-03-1994
			DE	69320484 D	24-09-1998
			EP	0660936 A	05-07-1995
			JP	8501632 T	20-02-1996
			WO	9407142 A	31-03-1994
			US	5674698 A	07-10-1997
			US	5736410 A	07-04-1998
WO 9503538	A	02-02-1995	EP	0660924 A	05-07-1995
			JP	8504955 T	28-05-1996
			US	5738825 A	14-04-1998
EP 0194132	A	10-09-1986	JP	61217745 A	27-09-1986
			US	5096807 A	17-03-1992
DE 4115414	A	12-11-1992	WO	9221020 A	26-11-1992
			EP	0538428 A	28-04-1993
			JP	6500178 T	06-01-1994
			US	5393401 A	28-02-1995
EP 0519622	A	23-12-1992	US	5156976 A	20-10-1992
			CA	2069538 A	08-12-1992
			JP	7174692 A	14-07-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/03535

A. KLASSEIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 GOIN21/64

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) gemäß dem internationalen Auskunfts- und Berichtssystem

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestpräzision: Klassifikationssystem und Klasse / Subklasse und die:

IPK 6 GOIN

Recherchierte Gebiet nicht zum Mindestpräzisität gehörende Veröffentlichungen, über welche diese unter den recherchierten Gebiete fallen:

Während der internationalen Recherche kontrollierte externe Datenbanken: Name der Datenbank: No evtl. verwandte Suchbegriffe:

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 723 146 A (STANFORD RES INST INT) 24. Juli 1996 siehe Seite 4, Zeile 26 - Seite 6, Zeile 9 siehe Seite 22, Zeile 39 - Seite 23, Zeile 9 siehe Abbildungen 7A,7B ---	1,2,7,9, 12
Y	WO 95 03538 A (BALZERS HOCHVAKUUM .ARTIFICIAL SENSING INSTR ASI A (CH); RUDIGIER) 2. Februar 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 5, Zeile 18 - Seite 6, Zeile 20 siehe Abbildungen 1-3 ---	1,2,7,9, 12
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Beständige Kategorien von vorliegenden Veröffentlichungen:

A: Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

B: älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist

C: Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung bestätigt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

D: Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, ohne Benutzung einer Ausstellung oder ähnliche Maßnahmen bezieht

Eine Antrag Patentanliege

T: Späterere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum über dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X: Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y: Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Rechtsbehelfszeitraum: 12 Monate ab dem Tag der Anmeldung
Büro für das Patentamt (Bundeskammer für Erfindungen und Schrifttum)

Rechtsbehelfszeitraum:

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/03535

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Inhaltsangabe der Veröffentlichung, welche direkt in die Antragsunterlagen einzuordnen sind	betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 194 132 A (DX CO LTD) 10. September 1986 siehe Seite 2, Zeile 22 - Zeile 31 siehe Seite 4, Zeile 9 - Seite 5, Zeile 7 siehe Seite 15, Zeile 23 - Seite 16, Zeile 14 ---	1
A	DE 41 15 414 A (KNOLL MEINHARD PROF DR) 12. November 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 6, Zeile 35 - Zeile 65 siehe Ansprüche 1-3 ---	1,3,9,13
A	EP 0 519 622 A (CIBA CORNING DIAGNOSTICS CORP) 23. Dezember 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 4, Zeile 43 - Zeile 46 siehe Spalte 10, Zeile 20 - Spalte 11, Zeile 28 siehe Abbildung 3 -----	11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Alle Daten zu den Patentrechten und deren Zusatzauskünften sind mitunter verdeckt.

STANZ- und Aktenzeichen:

PCT/EP 98/03535

Im Recherchebericht aufgeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung		Mitglieder der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0723146 A	24-07-1996		AT 170004 T CA 2144527 A DE 69320484 D EP 0660936 A JP 8501632 T WO 9407142 A US 5674698 A US 5736410 A		15-09-1998 31-03-1994 24-09-1998 05-07-1995 20-02-1996 31-03-1994 07-10-1997 07-04-1998
WO 9503538 A	02-02-1995		EP 0660924 A JP 8504955 T US 5738825 A		05-07-1995 28-05-1996 14-04-1998
EP 0194132 A	10-09-1986		JP 61217745 A US 5096807 A		27-09-1986 17-03-1992
DE 4115414 A	12-11-1992		WO 9221020 A EP 0538428 A JP 6500178 T US 5393401 A		26-11-1992 28-04-1993 06-01-1994 28-02-1995
EP 0519622 A	23-12-1992		US 5156976 A CA 2069538 A JP 7174692 A		20-10-1992 08-12-1992 14-07-1995

